

Acetylcholinesterase aus Rindererythrozyten. Reinigung und Eigenschaften des mit und ohne Triton X-100 solubilisierten Enzyms

Acetylcholinesterase from Bovine Erythrocytes. Purification and Properties of the Enzyme Solubilized in the Presence and the Absence of Triton X-100

Heinz Großmann und Manfred Liefländer

Institut für Chemie der Universität Regensburg, Universitätsstr. 31, D-8400 Regensburg

Z. Naturforsch. **34 c**, 721 – 725 (1979); eingegangen am 31. Mai/11. Juli 1979

Acetylcholinesterase, Bovine Erythrocytes, Affinity Chromatography, Multiple Molecular Forms

Acetylcholinesterase was released from bovine erythrocytes by Triton X-100 treatment and purified by twofold affinity chromatography. The detergentfree enzyme was obtained with a specific activity of 4130 U/mg (303 000-fold purification) and a 25% yield. Alternatively, the commercial available crude enzyme was purified. The latter preparation has an uniform molecular weight (M_r 175 000). The Triton-solubilized enzyme, however, can be resolved after removal of the detergent in eight multiple forms (M_r 175 000 and multiple values), in the presence of Triton there exists only one form (M_r 338 000). The amino acid composition of the two enzyme preparations differs significantly. No differences were observed with respect to other properties: SDS gel electrophoresis revealed two protein bands (M_r 166 000 and 86 000) with both preparations. The enzyme is a glycoprotein with a pI value of 4.3 and contains strongly bound phosphatidylethanolamine. The N-terminal amino acid has been found to be Glu (or Gln).

Acetylcholinesterase aus Rindererythrozyten wurde erstmalig von Berman [1, 2] affinitätschromatographisch gereinigt. Er ging dabei von kommerziell erhältlichem Rohenzym aus, das nach dem von Lesuk [3] beschriebenen Verfahren durch Inkubation der Erythrozytenmembranen mit einem Eiklar-Kochsalz-Medium solubilisiert worden war. Die gereinigte AChE hatte eine spez. Aktivität von 2 300 U/mg und ein einheitliches Molekulargewicht von 200 000. Im Gegensatz dazu fanden wir [4] und der Arbeitskreis von Brodbeck [5, 6] bei der AChE aus menschlichen Erythrozyten, die mit Triton X-100 solubilisiert worden war, in Abwesenheit des Detergents mindestens sechs multiple molekulare Formen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Reinigungsmethode des Enzyms auszuarbeiten, die direkt von den Rindererythrozyten ausgehend in größerem Maßstab durchführbar ist, und zu klären, ob die beschriebenen unterschiedlichen Eigenschaften der AChE auf die Solubilisierungsmethode zurückzuführen sind.

Abkürzungen: AChE, Acetylcholinesterase; BSA, Rinderserumalbumin; Dansyl-, 5-Dimethylamino-1-naphthalinsulfonyl-; DTNB, 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoësäure); SDS, Natriumdodecylsulfat.

Sonderdruckanforderungen an Dr. H. Großmann.
0341-0382/79/0900-0721 \$ 01.00/0

Experimenteller Teil

Materialien

Nach der Methode von Lesuk [3] hergestellte und lyophilisierte Acetylcholinesterase aus Rindererythrozyten (*Type I*) wurde von Sigma Chemicals GmbH (München) und [*phenyl-³H(N)*] Triton X-100 (1,58 mCi/mg) von NEN Chemicals GmbH (Dreieich) bezogen. Alle anderen Materialien siehe *l. c.* [7].

Bestimmung der Enzymaktivität und Proteinkonzentration

Zur Aktivitätsbestimmung wurde die photometrische Methode von Ellman [8] mit Acetylthiocholin als Substrat (0,67 mM) angewandt. Stark aktive Enzymlösungen wurden mit 0,01-proz. BSA in 0,15 M NaCl verdünnt. 1 Aktivitätseinheit (U) entspricht dem Umsatz von 1 µmol Substrat pro Minute. Proteinkonzentrationen wurden mit einer abgewandelten Lowry-Methode [9] bestimmt.

Synthese des Inhibitors und Herstellung des Affinitätsgels

Die Synthese des AChE-Inhibitors *m*-[6-(6-Aminocaproylamino)caproylamino] phenyltrimethylammoniumbromid-hydrobromid und seine Kupplung



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

an Sepharose 4 B erfolgte wie früher beschrieben [4]. Das verwendete Affinitätsgel hatte eine Beladung von 1,2 mmol Inhibitor pro Liter.

Solubilisierung der AChE mit Triton X-100 und affinitätschromatographische Reinigung

71 Rinderblut von frisch geschlachteten Tieren wurden mit 11 Citrat-Lösung [10] versetzt. Die Erythrozyten wurden abzentrifugiert (30 min bei $1500 \times g$), sorgfältig von den überstehenden Leukozyten abgetrennt und viermal mit 0,15 M NaCl gewaschen. Ausbeute ca. 2,4 l Erythrozyten.

1,21 Erythrozyten wurden durch Einröhren in 4,8 l 7 mM Phosphatpuffer, pH 7,4 hämolysiert, die Plasmamembranen abzentrifugiert (90 min bei $13\,500 \times g$) und noch zweimal mit Hämolysepuffer gewaschen. Die noch roten Membranen wurden eingefroren aufbewahrt.

Die gefrorenen Erythrozytenmembranen wurden portionsweise aufgetaut und in das gleiche Volumen einer 1-proz. Lösung von Triton X-100 in Wasser eingerührt. Dann wurde 1 h bei $23\,500 \times g$ zentrifugiert und der gallertige Rückstand verworfen.

Die weitere Reinigung der AChE und die Entfernung des Detergenz erfolgte mit zwei Affinitätssäulenläufen, wie sie von uns schon für das Enzym aus menschlichen Erythrozyten beschrieben worden war [4]. Zur Elution von der 1. Affinitätssäule genügen zwei Säulenvolumina Elutionspuffer; dadurch wird ein Einengen des Eluats unnötig. Beim 2. Affinitätslauf wurde die Säule vor der Elution des Enzyms zusätzlich mit zwei Säulenvolumina 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,4, 0,5 M NaCl gewaschen.

Reinigung der käuflichen AChE

455 mg salzhaltiges Rohenzym wurden mit 20 ml 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,4, 0,15 M NaCl gerührt und dann 1 h lang bei $48\,000 \times g$ zentrifugiert. Der Niederschlag wurde nochmals in gleicher Weise mit 10 ml Puffer extrahiert. Die vereinigten Überstände wurden auf eine Säule (1 × 17 cm) mit 13 ml Affinitätsgel gegeben (Durchflußgeschwindigkeit 10 ml/h), die mit obigem Puffer äquilibriert war. Die Säule wurde mit 250 ml des Auftragspuffers und dann mit 50 ml 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,4, 0,5 M NaCl nachgewaschen. Anschließend wurde die AChE mit 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,4, 0,5 M NaCl, 0,2 M Tetramethylammoniumchlorid als scharfer Proteinpeak eluiert, gegen Auftragspuffer dialysiert und bei $48\,000 \times g$ zentrifugiert.

Untersuchungsmethoden

Disk-Elektrophorese, Polyacrylamidgradientenelektrophorese, SDS-Gelelektrophorese, analytische isoelektrische Fokussierung, die enzymkinetischen Messungen und proteinchemischen Untersuchungen wurden wie unter *l. c.* [7] beschrieben durchgeführt.

Ergebnisse

Reinigung der mit Triton X-100 solubilisierten AChE (Tab. I)

Die Bindung der AChE an die Erythrozytenmembran ist beim Rind erheblich schwächer als beim Menschen; sie kann mit hypotonischem Puffer bis zu 80% in partikulärer Form von der Membran abgelöst werden [12]. Um eine derartige Ablösung zu vermeiden, wurde zur Hämolyse und zum Auswaschen nur wenig Puffer verwendet; nicht ausgewaschenes Hämoglobin kann bei der Affinitätschromatographie leicht abgetrennt werden. Zur optimalen Solubilisierung der AChE aus den Membranen waren höhere Tritonkonzentrationen nötig als beim menschlichen Enzym. Mit 0,5% Triton X-100 konnten durchschnittlich 75% der Aktivität in Lösung gebracht werden.

m - [6 - (6-Aminocaproylarnino)caproylarnino]phenyltrimethylammoniumbromid ist für die AChE aus Rindererythrozyten ein kompetitiver Inhibitor ($K_i = 0,4 \pm 0,1 \mu M$) und ist als Ligand zur Affinitätschromatographie sehr gut geeignet. Durchschnittlich 92% der aufgetragenen Enzymaktivität wurden von der 1. Affinitätssäule gebunden, 66% konnten mit Tetramethylammoniumchlorid 620-fach angereichert wieder eluiert werden. Beim darauffolgenden 2. Affinitätslauf wurden 95% der Aktivität gebunden; 71% konnten mit Tetramethylammoniumchlorid in tritonfreiem Puffer wieder von der Säule ausgewaschen werden. Mit 3H -markiertem Triton X-100 konnte nachgewiesen werden, daß das so erhaltene Enzympräparat praktisch kein Detergenz mehr enthält (< 1,5 µg Triton pro mg Protein). Mit dem pH-Stat-Test wurden mit Acetylcholin als Substrat 5 100 U/mg (25 °C) bzw. 5 460 U/mg (37 °C) ermittelt.

Reinigung der käuflichen AChE (Tab. I)

98% der aufgetragenen Aktivität wurden auf der Affinitätssäule festgehalten, 87% konnten mit Tetra-

Tabelle I. Anreicherung der AChE aus Rindererythrozyten.

	Volumen [ml]	Protein- konz. [mg/ml]	Gesamt- protein [mg]	Aktivität [U/ml]	Gesamt- aktivität [U]	Spez. Akt. [U/mg]	Anreiche- rungs- faktor	Ausbeute/ Stufe [%]	Gesamt- ausbeute [%]
Mit Triton X-100 solubilisiertes Enzym ^a									
Hämolsat ^b	36 000	69,9	2 516 000	0,95	34 200	0,0136	—	100	100
Plasmamembra- nen	6 240	7,86	49 000	3,85	24 000	0,49	36	70	70
Triton X-100-Ex- trakt ^c	10 020	3,22	32 300	1,80	18 000	0,56	41	75	53
1. Affinitätssäulen- lauf	213	0,162		34,6	56,2	11 970	346	25 400	66
2. Affinitätssäulen- lauf	19	0,109		2,07	450	8 550	4 130	303 000	71
Käufliches Enzym ^d									
Rohenzym Extrakt	—	—		254	—	785	3,10	—	100
Affinitätssäulen- lauf	30,0	7,64		229	24,7	742	3,24	1 05	94
	8,8	0,021		0,19	73,5	646	3 420	1 100	82

^a Durchschnittswerte aus vier Präparationen.^b Aus insgesamt 6 Ansätzen mit jeweils 1,2 l Erythrozyten.^c Aus insgesamt 12 Ansätzen.^d Durchschnittswerte aus drei Präparationen.

methylammoniumchlorid wieder eluiert werden. Der pH-Stat-Test bei 25 °C ergab mit Acetylcholin als Substrat 4 230 U/mg, während Berman mit seiner Reinigungsmethode bei diesen Testbedingungen 2 300 U/mg erhalten hatte.

Molekulare Eigenschaften der AChE-Präparationen

Das tritonsolubilisierte Enzym ließ sich nach Entfernung des Detergenz bei der Disk-Gelelektrophorese in 8 verschiedene Proteinbanden auftrennen. Alle Banden zeigten Esteraseaktivität und konnten auf Zucker angefärbt werden. Bei Proteinmengen > 50 µg pro Gel war eine schwache Anfärbung der drei stärksten Proteinbanden mit Sudanschwarz möglich, ein Hinweis, daß die gereinigte AChE in geringer Menge Lipid enthält. Das gereinigte käufliche Enzym hingegen zeigte bei der Disk-Elektrophorese nur eine Proteinbande, die sich auch auf Esteraseaktivität und Zuckergehalt anfärben ließ; die Lipoproteinfärbung war negativ (da aber nur wenig gereinigtes Enzym zur Verfügung stand, kann dies auch an der zu geringen Auftragsmenge liegen).

Bei der Elektrophorese in Polyacrylamidgradienten wurde die mit Triton solubilisierte AChE in Abwesenheit von Triton ebenfalls in 8 Banden

aufgetrennt. Die Molekulargewichte der ersten fünf Banden wurden auf $175\ 000 \pm 5\ 000$, $338\ 000 \pm 5\ 000$, $507\ 000 \pm 30\ 000$, $700\ 000 \pm 30\ 000$ und $850\ 000 \pm 50\ 000$ geschätzt. In Gegenwart von Triton wurde nur eine Bande beobachtet (M_r 338 000). Das gereinigte käufliche Enzym dagegen zeigte sowohl in Gegenwart wie auch in Abwesenheit des Detergenz nur eine Bande vom Molekulargewicht 175 000.

Die Molekulargewichtsbestimmung der Untereinheiten durch SDS-Gelektrophorese ergab für beide AChE-Präparationen dieselben Ergebnisse: Ohne Mercaptoäthanol als Disulfidbrücken spaltendes Reagenz wurde nur eine Bande gefunden (M_r 168 000 \pm 5 000), mit Mercaptoäthanol zwei nahezu gleichstarke Banden vom Molekulargewicht 86 000 \pm 1 000 bzw. 166 000 \pm 3 000. Beide Untereinheiten enthalten Zuckerreste.

Bei der analytischen isoelektrischen Fokussierung wurde für die mit Triton solubilisierte AChE nur eine mit Coomassie anfärbbare Bande gefunden (pI 4,28 \pm 0,04); mit der empfindlicheren Esteraseanfärbung kamen noch weitere Banden bei höheren pH-Werten zum Vorschein. Das gereinigte käufliche Enzym zeigte bei beiden Anfärbemethoden nur eine Bande (pI 4,2 \pm 0,1).

Enzymatische Eigenschaften

In Tab. II sind Michaeliskonstanten und Substratoptima der beiden AChE-Präparationen zusammengestellt. Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant. Das pH-Optimum des mit Triton solubilisierten Enzyms liegt bei $8,25 \pm 0,25$ (Acetylcholin als Substrat).

Die Stabilität des mit Triton solubilisierten Enzyms ist sehr gut. Nach 500 Tagen Lagerung bei 4°C hatte eine Enzymlösung ($40 \mu\text{g}/\text{ml}$) in $0,01 \text{ M}$ Phosphatpuffer, pH 7,4, $0,5 \text{ M}$ NaCl, $0,2 \text{ M}$ Tetramethylammoniumchlorid noch 96% der ursprünglichen Aktivität.

Proteinchemische Untersuchungen

Bei der Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren mittels Dansylierung und anschließender Hydrolyse wurde bei beiden AChE-Präparationen nur Glutaminsäure (oder Glutamin) gefunden. Eine ebenfalls bei beiden Präparationen zusätzlich beobachtete Verbindung wurde als Dansyl-Äthanolamin identifiziert; dieses dürfte unter den Reaktionsbedingungen aus Phosphatidyläthanolamin entstanden sein, welches fest an das Enzymprotein gebunden war.

Die Ergebnisse der Aminosäurenanalysen von beiden Enzympräparationen sind in Tab. III zusammengestellt. Der Hydroxyprolingehalt des tritonso-

Tabelle II. Michaeliskonstanten und Substratoptima der beiden AChE-Präparationen für die Substrate Acetylcholin und Acetylthiocholin bei pH 8,0 und 25°C .

		mit Triton X-100 solubi- lisiertes Enzym	käufliches Enzym
<i>Acetylcholin</i> (pH-Stat-Test $0,1 \text{ M}$ NaCl, $0,04 \text{ M}$ MgCl ₂ $0,005\%$ BSA)	K_m	$251 \pm 21 \mu\text{M}$	$256 \pm 16 \mu\text{M}$
Substratoptimum		2,0 mM	2,3 mM
<i>Acetylthiocholin</i> (pH-Stat-Test $0,1 \text{ M}$ NaCl, $0,04 \text{ M}$ MgCl ₂ $0,005\%$ BSA)	K_m	$131 \pm 4 \mu\text{M}$	$130 \pm 5 \mu\text{M}$
Substratoptimum		1,3 mM	1,45 mM
<i>Acetylthiocholin</i> (photometrischer Test 94 mM Phosphat $0,31 \text{ mM}$ DTNB)	K_m	$100 \pm 15 \mu\text{M}$	$101 \pm 8 \mu\text{M}$
Substratoptimum		670 μM	620 μM

Tabelle III. Aminosäurenzusammensetzung der AChE-Präparationen aus Rindererythrozyten (Angaben in mol/100 mol).

	mit Triton solubilisiertes Enzym ^a	käufliches Enzym ^b	käufliches Enzym nach Ber- man [2]
Asparaginsäure	$7,7 \pm 0,6$	$7,6 \pm 0,6$	8,0
Threonin	$3,8 \pm 0,2$	$4,4 \pm 0,1$	5,4
Serin	$6,3 \pm 0,6$	$10,5 \pm 0,3$	10,9
Glutaminsäure	$9,3 \pm 0,3$	$10,4 \pm 0,2$	11,2
Prolin	$8,8 \pm 0,5$	$7,8 \pm 0,4$	4,7
Glycin	$10,5 \pm 0,6$	$11,9 \pm 0,2$	13,2
Alanin	$10,0 \pm 0,3$	$9,0 \pm 0,1$	10,6
Cystein	$1,4 \pm 0,2$ ^c	$1,1 \pm 0,1$ ^c	0,8
Valin	$7,7 \pm 0,3$	$6,8 \pm 0,2$	7,3
Methionin	$1,4 \pm 0,6$	$1,5 \pm 0,9$	1,5
Isoleucin	$3,7 \pm 0,4$	$3,4 \pm 0,3$	2,8
Leucin	$10,2 \pm 0,5$	$8,6 \pm 0,3$	7,5
Tyrosin	$3,1 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,2$	3,2
Phenylalanin	$4,5 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,4$	3,5
Lysin	$1,5 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,1$	6,2
Histidin	$1,8 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,1$	1,6
Arginin	$6,5 \pm 0,4$	$5,3 \pm 0,4$	4,4
Tryptophan	$1,6$ ^d	—	—

^a Mittelwerte aus 25 Analysen

^b Mittelwerte aus 4 Analysen

^c als Cysteinsäure nach Perameisensäureoxydation

^d spektrophotometrisch.

lubilierten Enzyms wurde zu $0,04 \pm 0,03\%$ bestimmt.

Diskussion

Die tritonsolubilisierte AChE aus Rindererythrozyten konnte bis zu einer spezifischen Aktivität angereichert werden, die derjenigen des Enzyms aus menschlichen Erythrozyten [4, 5] sehr nahe kommt. Beim käuflichen Enzym erreichten wir nur einen um 17% niedrigeren Wert. Ursache dafür, sowie für die beobachteten Unterschiede in den molekularen Eigenschaften der beiden Enzympräparationen kann nur das Ablösungsverfahren von der Membran sein. Die AChE ist in der Membran in lipophile Bezirke eingebettet, vermutlich als Dimeres zweier Untereinheiten vom Molekulargewicht 170 000. Durch die relativ schonende Behandlung mit Triton X-100 wird sie in dieser Form aus dem Membranverband herausgelöst. Entfernt man das Detergenz, so entstehen unter Umorientierung hydrophober Bindungen aus dem Dimeren die verschiedenen Oligomeren und in geringer Menge auch das Monomere.

Die Ablösung des käuflichen Enzyms erfolgt durch bis zu 36-stündige Inkubation in Gegenwart von Eiklar und 1,6% NaCl bei pH-Werten zwischen

8 und 9 [3]. Dabei sind Veränderungen des Enzyms durch autolytische oder fremdenzymatische Abbauprozesse nicht auszuschließen. Zusätzlich können dem Enzym durch Toluol, das bei der Aufarbeitung zugegeben wird, fest gebundene Lipide entzogen werden [11].

Wir erklären uns deshalb die unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Enzympräparationen mit sekundären Veränderungen des käuflichen Enzyms.

Danksagung

Wir danken Frau Edith Schindler und Fräulein Angelika Wozniewski für ihre zuverlässige Mitarbeit und Herrn Dr. E. Schulze, Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Göttingen, für seine Hilfe bei der Mikrochromatographie der Dansyl-Verbindungen. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für eine Sachbeihilfe.

- [1] J. D. Berman u. M. Young, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **68**, 395 (1971).
- [2] J. D. Berman, Biochemistry **12**, 1710 (1973).
- [3] A. Lesuk, U. S. Patente 2 475 792 u. 2 475 793 (1949).
- [4] H. Großmann u. M. Liefländer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **356**, 663 (1975).
- [5] P. Ott, B. Jenny u. U. Brodbeck, Eur. J. Biochem. **57**, 469 (1975).
- [6] P. Ott u. U. Brodbeck, Eur. J. Biochem. **88**, 119 (1978).
- [7] H. Großmann u. M. Liefländer, Z. Naturforsch. **34 c**, 27 (1979).
- [8] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres Jr. u. R. M. Featherstone, Biochem. Pharmacol. **7**, 88 (1961).
- [9] H. Stegemann, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **319**, 64 (1960).
- [10] R. Richterich, Klinische Chemie, 3. Aufl., S. 95, S. Karger, Basel 1971.
- [11] G. Beauregard u. B. D. Roufogalis, Biochem. Biophys. Res. Commun. **77**, 211 (1977).
- [12] T. Fujii, Y. Komatsu u. M. Murofushi, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) **19**, 2325 (1971).

